

担癌マウスにおけるマクロファージ集積抑制現象

金沢医科大学血清学教室 (主任: 西東利男教授)

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

石 倉 康 宏

(昭和54年12月24日受付)

本論文の要旨は、第13回日本細菌学会中部支部総会において発表した。

担癌宿主は免疫応答に障害があり、免疫不全状態、あるいは免疫監視機構の攪乱状態にあることが知られている。その結果自己(正常細胞)と非自己(癌細胞)とを識別することが十分に行われず、癌細胞に対する免疫抵抗性の誘発と発現も不十分となる。そこで、免疫応答のどの過程に障害があり、どの細胞の障害が一次的であるかを解析することは、癌患者の免疫不全状態を改善する上でも重要な知見を与えるであろう。

担癌宿主に、宿主が担っている癌細胞とは無関係な抗原を投与して免疫応答性を測定すると、多少にかかわらず低下がみられ、特に細胞性免疫の抑制が体液性免疫にくらべ顕著である^{1)~4)}。これを細胞レベルで解析すると、癌の種類、進行度、存在部位によって異ってはいるが、T細胞^{4)~6)}、B細胞^{6)~7)}の両者に活性の抑制が認められ、特にT細胞の抑制が著しいことが最近の研究で明かにされている。ところが、免疫応答の重要な担い手であり、また微生物の感染防禦、癌抵抗性にも重要な役割を果すマクロファージ(Mp)に関しては報告が少なく、T細胞、B細胞のように詳細に研究されていない。

最近、Northら^{8)~10)}は担癌初期マウスに *Listeria monocytogenes*(Lm)を感染させると、感染に対する抵抗性が正常マウスにくらべ抑制されていること、その抵抗抑制因子が血清中に存在することを報告した。このLm感染に対する抵抗抑制現象は、Lm感染初期における宿主の防禦にMpが重要な役割を果すという知見^{10)~12)}から推察すると、担癌によってMpの機能が

抑制されたためと見なすことができる。したがって、担癌初期マウスに見られるLm感染抵抗抑制機序を解明することは、この現象が免疫成立前に見られることから、他の免疫担当細胞の影響受けない時期の担癌初期宿主におけるMpの機能障害を解明することを可能にする。

そこで、著者はこのLm感染抵抗抑制機序を、Mpが持つ種々の機能、即ち貪食能、殺菌能、集積能、lysosomal enzyme 活性化能などの面から追求し、併せてこの現象が癌細胞移植によって特異的に引き起こされるか否かを検討した。その結果、担癌初期マウスにおけるLm感染抵抗性の低下は、MpのLm増殖部位への集積抑制が原因であり、それは癌細胞から産生される低分子物質を介しておこることが明らかとなった。以下その実験成績を述べる。

材 料 と 方 法

I. 実験材料

1. 供試マウス: ddy, DBA/2, BALB/C, ICR の体重 28 ~ 30g 雄マウスを用いた。
2. 実験に供した細菌: Lm(新潟大学細胞学教室より分与), *Yersinia enterocolitica* 0:3 型(東京都衛生研より分与, Ye), *Streptococcus* A 群 12 型, G 群(富山衛研より分与, Str.A12, Str.G, 以後記す菌は全て富山衛研より分与を受けた), *Staphylococcus aureus* (Staph.), *Salmonella enteritidis* (S. ent.), *Pseudomonas aeruginosa* 5 型 (Psa)を用いた。これ

Inhibition of Macrophage Accumulation in Tumor-bearing Mice **Mitsuhiro Ishikura**,
Department of Serology(Director: Prof. T. Saito), Kanazawa Medical University.
Department of Pathophysiology(Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

らの菌株は, Trypto-soy または Todd Hewitt 培地で一夜培養し, 3500rpm, 20 分遠心により集菌した. 更にこれを, pH 7.3 のリン酸食塩緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し, 菌数測定に一部を取り, 残りは -70 °C で実験に供するまで保存した.

3. 実験に供した細胞

1) 癌細胞: ddy マウス腹腔内に継代, 維持された Ehrlich 腹水癌細胞 (EAT) と sarcoma-180 (S-180) を用いた. 実験に際して両細胞は, 腹腔から採取後, pH 7.3 の PBS を用い, 500rpm, 5 分の遠心で 3 回洗浄し, 混入している Mp やリンパ球などをできるだけ排除した後に実験に供した.

2) 脾細胞: ddy, ICR マウスの脾を摘出し, 斎藤ら¹³⁾の方法で調製した.

3) 培養細胞: DBA/2 マウス肺細胞 (初代培養) を用いた. 培養には 5 ~ 10 % 牛胎児血清加 Eagle's MEM (FCS-MEM) を使用した.

4) 担癌マウス血清: 癌細胞を後右足趾皮下に移植後, 目的とする時間に大腿部動脈より無菌的に採血後 (10 ~ 20 匹プール), 血清を分離した. 血清は実験に供するまで -70 °C で保存した.

5) ホルマリン固定ヒツジ赤血球 (F-SRBC): 0.5 % ホルマリン加生理食塩液で一夜ヒツジ赤血球を処理し, よく洗浄後, 10^9 /ml の濃度で Hank's 液に浮遊させ, 4 °C で保存したものをを用いた.

6) phytohemagglutinin (PHA): phytohemagglutinin-p (Difco) を蒸留水で溶解し, pH 7.3 の PBS で希釈して用いた.

II. 実験方法

1. 感染実験

1) 静脈および腹腔内感染と菌数算出法: 10^6 の癌細胞 (EAT, S-180) はマウス後右足趾皮下に移植後, 設定された時間に菌液を静脈または腹腔内に注射した. 一定時間後に無菌的に肝を切除し, potter 型ガラスホモジナイザーでホモジナイズしたホモジネートあるいは腹腔洗液 (pH 7.3 の PBS 5 ml を腹腔内に注射し, 腹部をよくもんだ後に吸引した液) を Trypto soy または血液寒天平板に塗抹培養し, 肝, 腹腔当りの菌数を算出した.

2) 足趾内感染と菌数算出法: 右後足趾皮下に 10^6 の癌細胞または正常マウスの脾細胞を, 左後足趾に PBS (0.05 ml) を注射し, 2 時間後に各々の足趾皮下に 3×10^5 の Lm を感染させた. 目的とする時間に脚部を切断し, PBS (pH 7.3) を 3 倍量加え, ガラスホモジナイザーでホモジナイズ後, 肝同様に平板培地に塗抹培養し, 足趾当りの菌数を求めた.

2. Mp の集積と定量法

1) 細菌感染刺激による方法: Lm (3×10^8) または Ye (10^6) は, 癌細胞あるいは正常脾細胞を足趾に移植後 24 時間目のマウスの腹腔内に感染させた. 腹腔細胞は, 1 % マウス血清と 5 unit/ml のヘパリンを含む PBS 5 ml を腹腔内に注射し, 腹部をよくもんだ後に注射器で洗液を吸引, 採取した. 腹腔細胞を含む洗液は 800rpm の遠心で細胞を集め, これを更に PBS で 2 回洗浄した後に浮遊液とし, 一部を Turk's 液で染色して総有核細胞数を血球計算盤で求め, 一部を塗抹乾燥後, ライト-ギムザ染色を行って 500 個の細胞から Mp, 多核白血球 (PNC), リンパ球 (Ly) の比を求めた. そして, 総有核細胞数と上述の比から, 腹腔内の各細胞の絶対数を算出した.

2) PHA による集積と定量法

i) 腹腔内集積と定量法: Snyderman ら¹⁴⁾の方法に準じて行った. 即ち, 60 μ g の PHA を前処置したマウスの腹腔内に注射し, 24 時間後に腹腔細胞を採取し, 構成細胞数を上述の方法で算出した.

ii) 足趾内集積と定量法: 癌細胞または正常脾細胞移植 24 時間目のマウスの後右足趾に 60 μ g の PHA を, 後左足趾に PBS (0.05 ml) を注射し, 24 時間後に両足趾の厚さの差から足趾反応の index を求めた.

index =

$$\frac{\text{PBS 注射部位の厚さ} - \text{PHA 注射部位の厚さ}}{\text{PBS 注射部位の厚さ}} \times 100$$

3. 貧食能と殺菌能試験

1) 生体内における貧食能

i) Lm に対する貧食能と殺菌能: 担癌と正常マウスの腹腔内に 5×10^7 の Lm を注射し, 30, 60, 90 分に 5 ml の PBS で腹腔を洗浄し, 洗液を採取した. 洗液の一部は, ガラスホモジナイザーで軽くホモジナイズして総菌数を, 残りの洗液は, 1000rpm 5 分間遠心して上清と沈渣に分け, 上清は細胞 free の生菌数を, 沈渣 (細胞) は PBS に再浮遊させ, 軽くホモジナイズして細胞結合 Lm 数をそれぞれ Trypto soy 寒天平板に塗抹して求めた.

ii) F-SRBC に対する貧食能: 担癌および正常マウス腹腔内に F-SRBC を 10^8 個注射し, 60 分後に 5 unit/ml ヘパリン加 -MEM の 5 ml で腹腔を洗浄し, 腹腔細胞を採取した. 腹腔細胞は冷 MEM を用い, 500rpm 5 分の遠心条件で 3 回洗浄後, 15 % FCS-MEM に浮遊させ, これをカバーガラスの入った 35 mm シャーレに 10^6 個を注入し, CO₂ フラン器内で 60 分静置し, カバーガラスに粘着させた. カバーガラスは, 37 °C に加温した MEM で洗浄して浮遊細胞を除き, 乾

燥させ、ライト・ギムザ染色を行った。負食率は顕微鏡下で500個以上の細胞をかぞえ、F-SRBCを2個以上貧食しているMpの率で、また貧食indexは100個のMpが貧食したF-SRBCの数で表した。

2) 試験管内における貧食能: 正常マウス腹腔細胞を上述の方法に従って採取し、カバーガラスに粘着させた。粘着細胞(95%以上Mp)は20%正常または担癌血清加MEMで培養した。3時間後、最初に植込んだ腹腔細胞数の100, 50, 25倍数のF-SRBCを加え、CO₂フラン器内で1時間貧食させた。以後は上述した方法で貧食率、貧食indexを算出した。

4. 腹腔細胞のlysosomal enzymeの定量法

1) 試料の調製: 担癌および正常脾細胞移植マウスの腹腔内固有の腹腔細胞と加熱したLm(10⁶)で誘導(96時間)した腹腔細胞は、5unit/mlヘパリン加MEMを用い腹腔から採取した。これを1000rpm5分間遠心し、上清を除き、沈渣にTris-NH₄Clを1ml加え、37℃に5分間置き、混入している赤血球を溶血させ、冷MEMで3回洗浄した。洗浄腹腔細胞は10⁶/mlに調製し、その1mlを1000rpm10分間遠心後、沈渣に0.05% digitonin液1mlを加え、細胞を溶解させた。一方、腹腔細胞をプラスチックシャーレに37℃1時間粘着させ、37℃加温MEMで十分に洗浄して浮遊細胞を除いた後、粘着細胞をはがし、細胞数を10⁶/mlにそろえ、上述したと同様な操作で細胞を溶解させた。これを2000rpm20分遠心し、上清は酵素活性測定用試料とした。

2) 酵素活性の測定法: 乳酸脱水素酵素(LDH)と酸性フォスファターゼ(Ap)は測定用キット(和光)を用い、リゾチームは卵白リゾチーム(和光)を標準として、Schnyderら¹⁵⁾の方法によって測定した。

5. Lm感染抵抗因子とMp集積抑制因子のSephadexゲル濾過による分画法

1) 分画試料: EAT担癌24時間目のマウス血清、EAT10⁶を腹腔内に移植24時間目の腹腔洗液の遠心上清(凍結乾燥により1/10に濃縮)、EAT10⁷/mlの超音波破壊上清を用いた。これらの試料はあらかじめLm感染抵抗抑制活性があることが確認されている。

2) 分画法: SephadexG75(2.5×39cm)、SephadexG200(2.5×41cm)のカラムを用い、試料5mlを負荷し、0.005Mリン酸緩衝液(pH7.2)を溶出液として20ml/hの速度でゲル濾過を行った。

3) 分子量測定法: 上述のカラムを用い、分子量マーカー蛋白(Boehringer Manneheim)とpolyethylene glycol(半井化学)の流出位置を測定し、試料の分子量を算出した。

4) 活性測定法: void volumから順番に6~7画分に分け、凍結乾燥で1/10容量に濃縮した、これをマウス背部皮下内に0.3ml注射し、2時間後にLm(2×10³)を静脈内に、PHA(60μg)を腹腔内に注射し、24時間後に腹腔のMp数を測定して集積抑制活性を、3日後に肝を摘出して生菌数を測定し、Lm感染抵抗抑制活性を調べた。

成 績

I. 担癌初期マウスのLm感染に対する抵抗性の抑制

1. 肝臓内でのLm増殖

マウスの同種移植腫瘍であるEATとS-180を各系統マウスの足趾皮下に移植2時間後にLm(3×10³)を静脈内に感染させ、経日的に肝臓当りの生菌数を測定した。Fig. 1に示すごとく、担癌マウスは対照群(足趾にPBS注射)に比べ、どの系統のマウスも感染2日目でおおよそ10倍、3日目では100~1000倍菌数が多く、癌移植によってNorthら¹⁶⁾のいうLm感染抵抗性の抑制が認められた。一方、正常脾細胞(ddy, ICR脾細胞)を足趾に移植(10⁶)したマウスでは抵抗抑制現象は認められなかった。またマウスの系統による差はほとんど認められなかったため、以後ddyマウスとEAT、S-180の同種移植癌細胞の系を使用して実験を進めた。

2. 癌移植部位でのLm増殖

Fig. 2に示すように、正常脾細胞移植足趾内での感染5日目のLm増殖差は対照のPBS注射足趾にくらべわずかであった。それに反し、EAT移植足趾では、100倍の菌数差が認められ、また脾細胞移植足趾に比べても、おおよそ100倍菌数が多く、癌細胞移植局所においても、Lm感染抵抗性の抑制が確認された。

II. 他の細菌感染に対する抵抗性

LmはMp寄生菌である。そこで、Lm感染で認められた担癌初期マウスの抵抗抑制がMp非寄生菌の感染によっても見られるかどうかを検討した。EAT担癌24時目のddyマウスに各細菌をFig. 3に示す感染量で静脈内に注射し、24時間後に、肝、腎当りの生菌数を測定した。Mp非寄生菌であるStaph., Psaは対照のPBS注射群との間に菌数差がなく、Psaの感染に対しては、10⁸の感染量にもかかわらず、24時間以内に両群とも完全に除去されていた。しかしながら、Str. A12およびGに対しては担癌マウスに抵抗性の抑制が認められた。一方、Mp寄生菌であるS. ent., Yeの感染に対してはLm感染でみられたと同様な感染抵抗抑制が観察された。

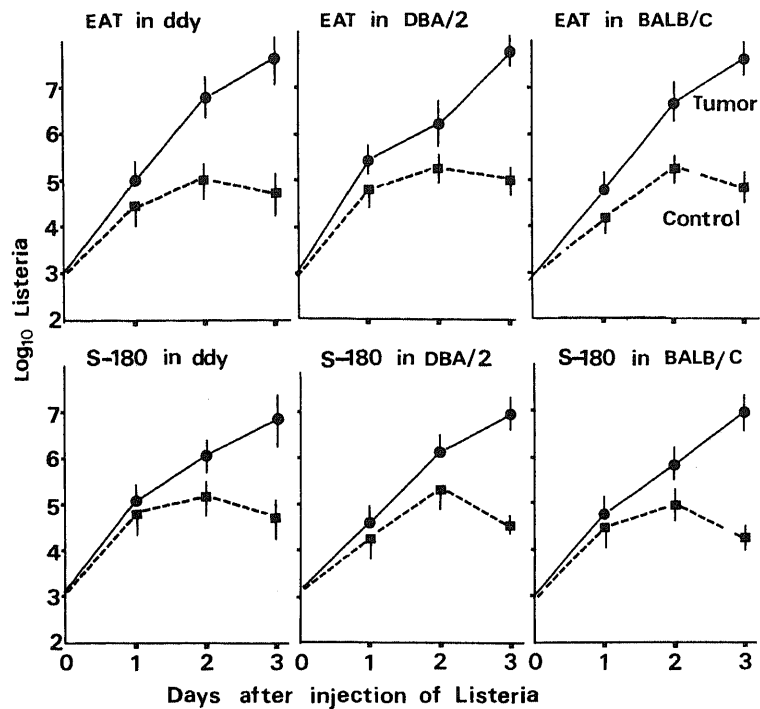


Fig. 1. Suppression of anti-Listeria resistance after subcutaneous injection of tumor cells. Mice were injected into the light-hind foot pad with 10^6 cells of the Ehrlich's or sarcoma-180 ascite tumor. 2hrs later the mice were injected intravenously with sublethal dose of Listeria, and the growth of organism in the liver was compared with that of control mice. Means \pm S.E. of five mice per time point.

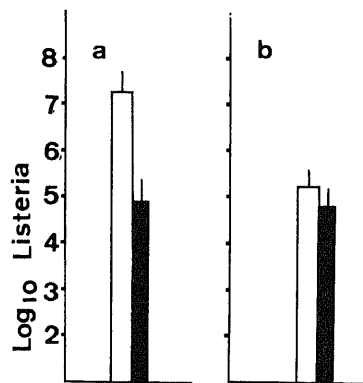


Fig. 2. Growth of Listeria inoculated into the foot pad of tumor-bearing or normal-spleen-cell-implanted mice. 10^6 cells of Ehrlich's ascite tumor or normal spleen were injected into the right-hind foot pad and PBS into the left-hind as control. 2hrs later 3×10^5 cells of Listeria were inoculated into the both foot pads and the growth of Listeria was observed on the 5th day. Means \pm S.E. of five mice. a: tumor-bearing foot pad. b: normal-spleen-cell-implanted foot pad. Black column as control.

Ⅲ. 感染抵抗性抑制に働く液性因子

1. 担癌血清

North ら⁹⁾は同系または同種腫瘍細胞をマウスに移植すると、移植初期より血清中に Lm 感染に対する宿

主抵抗性を抑制する因子が存在することを報告している。この血清中の抑制因子が著者の実験系においても認められるかどうかを検討した。Fig. 4 に示すように、担癌 24 時目に採取した血清を腹腔内に注射した実験

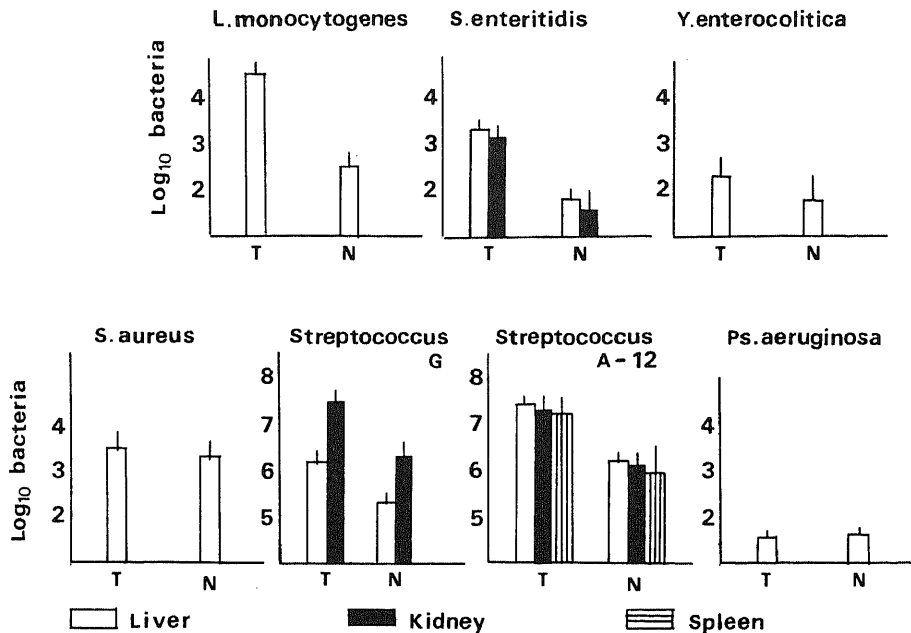


Fig. 3. Anti-bacteria resistance of tumor-bearing mice against the infection of various bacteria. 10^6 cells of the Ehrlich's ascite tumor were injected into the right-hind foot pad. 24hrs later, various bacteria were inoculated intravenously and the bacterial growth in the liver, kidney, and spleen was counted after 24hrs. Means \pm S.E. of five mice. Infected dose: L.m. 3×10^3 , S.ent. 1×10^5 , Y.e. 1×10^6 , S.aur. 1×10^6 , Strep.hemo. A-12 or G 1×10^6 , Ps.a. 1×10^8 . N: normal mice. T: tumor-bearing mice.

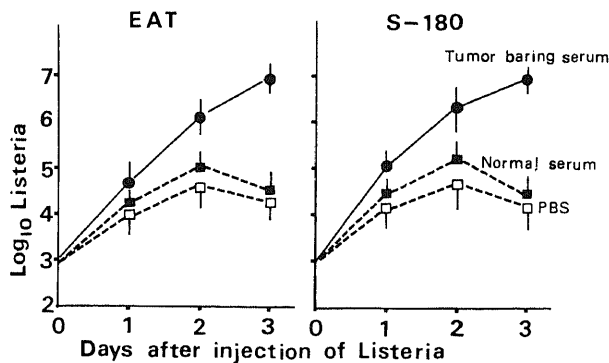


Fig. 4. Suppression of anti-Listeria resistance with serum from tumor-bearing mice. Normal mice were injected intraperitoneally with 0.5ml of serum from tumor-bearing mice (24hrs after the injection of Ehrlich's or salcoma-180 ascite tumor cells). 2hrs later the mice were injected intravenously with sublethal dose of Listeria, and the growth of organism in the liver was compared with that of control mice. Means \pm of five mice per time point.

群は正常血清注射群にくらべLmが肝内でよく増殖し、本実験系(ddyマウス \leftrightarrow EAT,S-180)においても、North⁹⁾のいう感染抵抗性抑制因子が担癌初期血清中に確認された。ついで、この感染抵抗抑制因子が癌移植後どのくらい血清中に存在するかを検討したところ、抵抗抑制活性は癌移植24時目に採取した血清で最も高く、有意な活性は9日目においても以然として認められた(Fig. 5)。

2. 癌移植部位組織の抽出液

ddyマウスの後足足趾にEATを対照として、ICRマウスの脾細胞をそれぞれ 10^6 個移植した後、経日的に脚部を切断し、PBS(pH 7.3)を3倍量加えてホモジナイズした。このホモジネート遠心上清を、正常マウスの腹腔内に0.5 ml注射した。2時間後に 2×10^4 のLmを腹腔内に感染させ、3日後に肝および腹腔内のLm生菌数を測定した。癌移植足趾抽出液は、対照の脾細胞移植足趾抽出液に比べ、肝、腹腔内におけるLm増殖を有意の差で促進させる作用が認められた。また担癌血清と同様に、癌移植6日目の足趾抽出液にも以然として高い感染抵抗抑制活性が認められた(Fig. 6)。

3. 腹腔洗液

腹腔洗液は、 10^6 個のEATをddyマウス腹腔内に移植24時間目に5 mlのPBSを腹腔内に注射し、よく腹部をもんだ後、注射器で吸引し採取した。この洗

液の遠心上清を正常マウス腹腔内に0.5 ml注射し、Lm感染抵抗抑制活性を正常脾細胞(ddy, ICR)移植マウスの腹腔洗液と比較したところ、前者は有意に高いLm感染抵抗抑制活性が認められた。

4. 癌細胞抽出液

PBS(pH 7.3)に浮遊したEATあるいはS-180(10^7 /ml)を超音波で破壊し、12,000rpm遠心上清の感染抵抗抑制活性を対照のICRマウス脾細胞抽出液と比較した。肝におけるLm数の差(感染3日目)は10~50倍程度であり、担癌血清、癌移植部位の抽出液、腹腔洗液に比べると弱い活性を示した。しかし対照の脾細胞抽出液に比べるとその差は有意であった。

IV. 担癌マウスにおけるMpの機能

1. 貧食能と殺菌能

EAT担癌マウス腹腔内に 5×10^7 のLmを感染させ、経時的に腹腔Mpの貧食能と殺菌能を測定した。結果はFig. 7に要約した。

Lmに対する貧食能は癌移植後3日目まで対照の正常マウスと同様な値を示したが、6日目をすぎると増大した。一方、殺菌能については、癌移植後1日目と2日目のマウスで若干抑制を、6~9日目で増強を思わせる成績を得たが、統計的には有意の差ではなかった。次に、EAT担癌24時間目のマウス腹腔にF-SRBC(10^6)を注射し、担癌マウスMpの貧食能を試

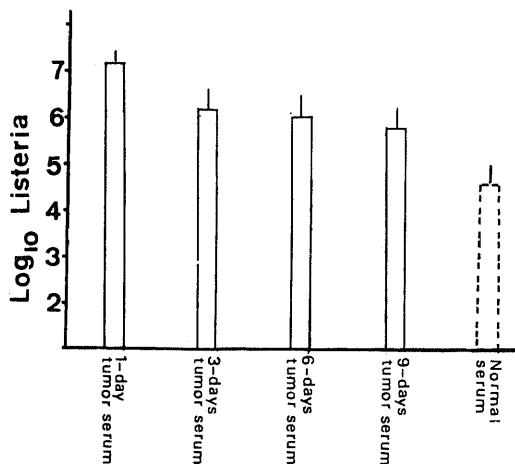


Fig. 5. Suppression of anti-Listeria resistance with serum from tumor-bearing mice at various time interval between the tumor implantation and serum sampling. Normal mice were injected intraperitoneally with 0.5ml of serum taken from 1 to 9 days after Ehrlich's ascite tumor implantation. 2hrs later the recipient mice were injected intravenously with sublethal dose of Listeria, and the growth of organism in the liver was compared with that of control 3 days after infection of Listeria. Means \pm S.E. of five mice per time point.

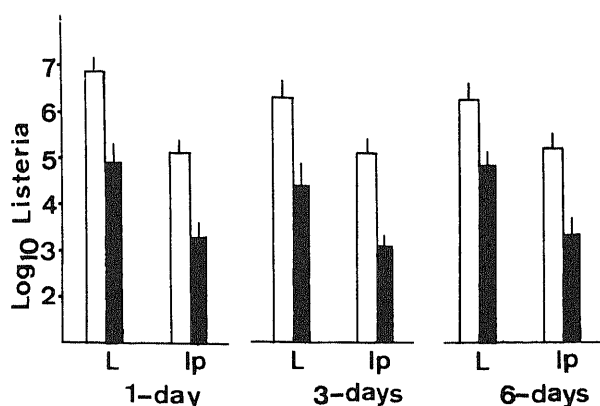


Fig. 6. Suppression of anti-Listeria resistance with homogenated-supernatant of tumor-bearing foot pad tissue. Mice were injected into the hind foot pad with 10^6 cells of the Ehrlich's ascite tumor or normal spleen. 1 to 6 days later tumor-bearing foot pad were cut, homogenized, and centrifuged. Recipient mice were injected intraperitoneally with 0.5ml of supernatant. 2hrs later 2×10^4 cells of *Listeria* were injected intraperitoneally, and the numbers of organism in the liver and peritoneal cavity were compared with those of control mice after 3 days. Means \pm S.E. of five mice. White column: supernatant of tumor-bearing foot pad. Black column: supernatant of normal spleen cell-bearing foot pad.

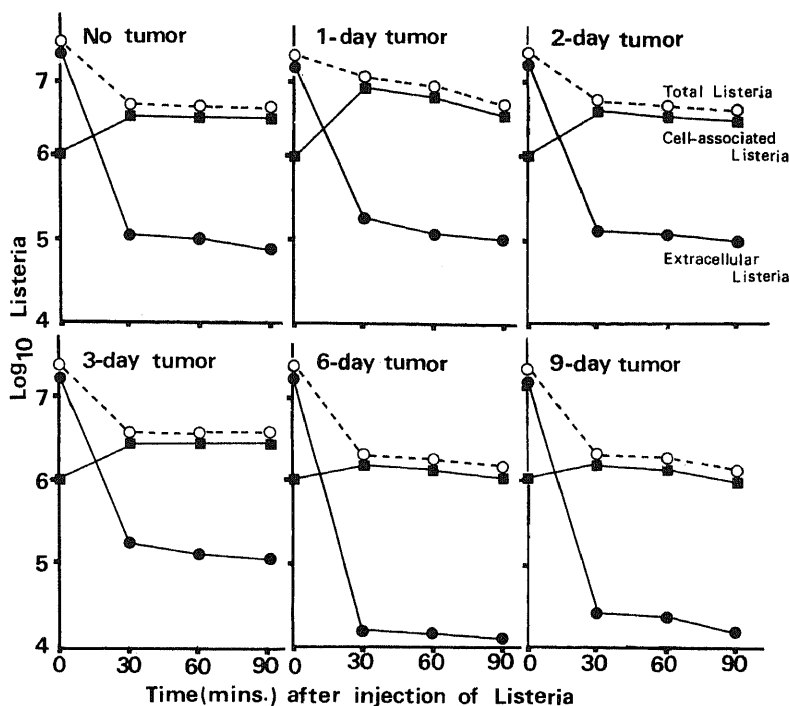


Fig. 7. Phagocytic and bactericidal activity of resident peritoneal macrophage against the *Listeria* in tumor-bearing mice. Mice were injected into the right-hind foot pad with 10^6 cells of the Ehrlich's ascite tumor. 24hrs later 5×10^7 cells of *Listeria* were injected intraperitoneally, and the numbers of *Listeria* were counted (in lavage cells or lavage fluid from peritoneal cavity) at 30, 60, and 90 mins after *Listeria* injection. Means of three mice per time point.

験した。Table 1 に示すように正常と担癌マウスの間では F-SRBC 貧食能にも差は見られなかった。

2. 貧食能におよぼす担癌血清の影響

感染抵抗性抑制作用をもつ担癌血清が、正常腹腔 Mp の貧食能に影響をおよぼすかどうかを in vitro の系で検討した。結果は Table 2 のようである。最初に植込んだ腹腔細胞数の 100 倍数の F-SRBC を貧食させた実験では、担癌血清による貧食抑制作用は認められなかったが、貧食血球数を 1/2, 1/4 に減少させると、貧食 index が低下することが判明した。

V. 担癌マウスにおける Mp の lysosomal enzyme 活性

Mp の活性化および抑制の指標としてよく用いられる lysosomal enzyme 活性を、手軽に測定できる LDH, Ap, Lz の 3 つの酵素を選び測定した。担癌 24 時間目のマウスの腹腔内固有総有核細胞または粘着細胞 (Mp) の酵素活性は、脾細胞移植マウスのそれと比較して 3 つの酵素活性値に差は認められなかった。一方、担癌マウス Mp の酵素活性化能を検討するために癌細胞または正常脾細胞 (10^8) を右後足趾に移植 2 時

Table 1. Phagocytic activity in vivo of the tumor bearing mice

	Mice injected with a)	Per cent of Phagocytosis b)	Phagocytic index c)
Exp. 1.	EAT cell	65 ± 6	262 ± 27
	Spleen cell	67 ± 8	248 ± 21
Exp. 2.	EAT cell	59 ± 5	220 ± 26
	Spleen cell	60 ± 9	240 ± 31

a) Mice were injected into the right-hind foot pad with 10^6 cells of Ehrlich's ascite tumor or spleen cells from the same strain. 24hrs later 10^8 of F-SRBC were injected intraperitoneally and the peritoneal cells were collected 1hr later. Cells were adhered to the cover slip for 1hr at 37C.

b) Per cent of phagocytosis was expressed as (no. of F-SRBC ingested cells/500 adherent cells) x 100. Means ± S.E. of five mice.

c) Phagocytic index was expressed as numbers of F-SRBC per 100 adherent cells. Means ± S.E. of five mice.

F-SRBC: formaldehyde-treated sheep erythrocyte.

Table 2. Effect of serum from tumor-bearing mice on phagocytosis of cultured macrophage

Serum added	Per cent of phagocytosis (Phagocytic index)		
	F-SRBC (1×10^8)	F-SRBC (5×10^7)	F-SRBC (2.5×10^7)
20% EAT tumor-bearing serum	98±3(580±63)	84±6(192±25)	26±8(47±11)
20% normal serum	99±4(610±58)	87±9(413±30)	37±9(112±20)
20% fetal calf serum	99±2(620±72)	90±8(400±35)	42±6(130±26)

a) 1×10^6 peritoneal cells from normal mice were cultured with the indicated serum. 2hrs later the F-SRBC were added and incubated for 2hrs at 37C in CO₂ incubator.

b) Mean values ± S.E. from six replicate cultures.

間後、両群マウスの腹腔内に Lm 加熱死菌 (10^6) を注射し、3 日後に腹腔から採取した粘着細胞 (Mp) の酵素活性を比較したところ両群の間に有意な差は認められなかった (Table 3)。

VI. 担癌マウスの Mp 集積抑制

1. 細菌感染に対する集積抑制

担癌および正常マウスの腹腔内に 3×10^3 の Lm を感染させ、経日的に腹腔細胞数と腹腔 Lm 数を測定した。正常マウスでは Lm 感染により腹腔 Mp 数が急激に増加する。これに反し、担癌マウスではゆるやかに増加し、Lm 感染局所への Mp 集積が抑制されている。Lm の腹腔内での増殖を見ると、正常マウスでは感染 2 日目以後増殖が見られなくなるのに反し、Mp の集積が抑制されている担癌マウスでは増殖を続け、感染局所への Mp の集積と Lm 増殖には密接な関係があることが示唆された。一方、PNC の集積を正常脾細胞 (ddy) マウスと比較すると、担癌初期マウスでは Mp 同様に PNC も抑制されているが、変動が激しく、またその差は Mp ほど顕著ではない (Fig. 8)。

ついで、Ye を 10^6 腹腔内に感染させて同様の実験を行った (Fig. 9)。Ye 感染に対して腹腔内に集積される Mp 数は、Lm 感染に対すると同様に担癌マウスで

有意に抑制されているが、PNC の集積は Lm 感染と異なり、正常マウスとの間に有意な抑制差は認められなかった。

2. PHA 刺激に対する集積抑制

正常脾細胞および癌細胞足蹠移植マウスに $60\mu\text{g}$ の PHA を腹腔に注射し、24 時間後に腹腔内に集積される Mp と PNC 数を測定した。癌細胞移植マウスは、正常脾細胞移植マウスに比べて Mp の集積が 40～50% 抑制されており、また PNC の集積は変動が激しく、およそ 20% の抑制が認められた (Table 4)。次に、癌細胞または正常細胞を 10^6 個背部皮下に移植して 2 時間後に $60\mu\text{g}$ の PHA を後足蹠皮下に注射し、注射後 24 時間目に足蹠の厚さを測定した。癌細胞移植マウスは正常脾細胞移植マウスに比べ足蹠反応 index 値が低く、腹腔内の場合と同様に PHA 刺激足蹠へも Mp の集積が抑制されていることが示唆された (Table 5)。

VII. 担癌血清と癌細胞抽出液の Mp 集積抑制作用

正常および担癌血清を 0.3 ml 背部皮下に注射し、2 時間後に $60\mu\text{g}$ の PHA を腹腔内に注射し、24 時間後に腹腔に集積する Mp の数を測定した。EAT 担癌マウスの 1～9 日目までに採取した血清を背部皮下に注射したマウスは、正常血清注射マウスに比べ Mp の集積

Table 3. Activity of lysosomal hydrolases in the resident- or *Listeria*-induced-peritoneal exudate cells from tumor-bearing mice.

Pretreatment ^{a)}	Enzyme	Unit	Activity per 10^6 cells ^{c)}		
			Lavage cells	Adherent cells	
			Resident cell	Resident cell	L.m.-induced cell ^{b)}
EAT cell	Lactate dehydrogenase	mU	139.000±39	68.000±18	78.000±12
	Acid phosphatase	mU	0.753±0.08	0.415±0.08	0.815±0.16
	Lysozyme	mcg	10.000±1.70	7.800±1.90	12.000±3.60
S-180 cell	Lactate dehydrogenase		132.000±30	70.000±23	85.000±13
	Acid phosphatase		0.870±0.10	0.385±0.05	0.625±0.10
	Lysozyme		7.600±1.80	8.300±1.70	11.000±2.80
ddy spleen cell	Lactate dehydrogenase		128.000±28	65.000±18	86.000±20
	Acid phosphatase		0.705±0.10	0.312±0.06	0.614±0.15
	Lysozyme		10.300±1.80	8.500±3.50	10.500±2.30

a) Mice were injected subcutaneously (foot pad) with 1×10^6 indicated cells and the peritoneal cells were collected 24hrs after the implantation. Cells were, directly, or after adherence to the plastic plate, subjected to the enzyme assay.

b) *L. monocytogenes* induction was contacted with 1×10^6 heat-killed organisms 2hrs after tumor implantation, and peritoneal cells were collected 3 days later.

c) Mean values±S.E. from 5 to 7 determinations.

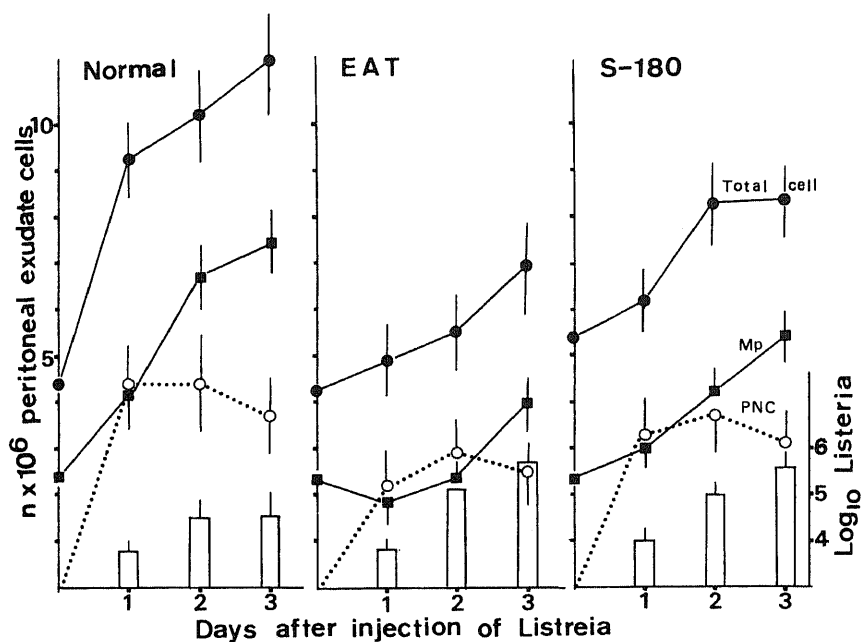


Fig. 8. Growth of *Listeria* and yields of *Listeria*-induced peritoneal exudate cell in tumor-bearing mice after *Listeria* infection. Mice were injected into the right-hind foot pad with 10^6 cells of the Ehrlich's or sarcoma-180 ascite tumor. 24hrs later 3×10^5 cells of *Listeria* were injected intraperitoneally, and the numbers of peritoneal exudate cells and *Listeria* in the peritoneal cavity were compared with those of control mice. Means \pm S.E. of five mice per time point. Mp: macrophage. PNC: polymorphonuclea leukocyte.

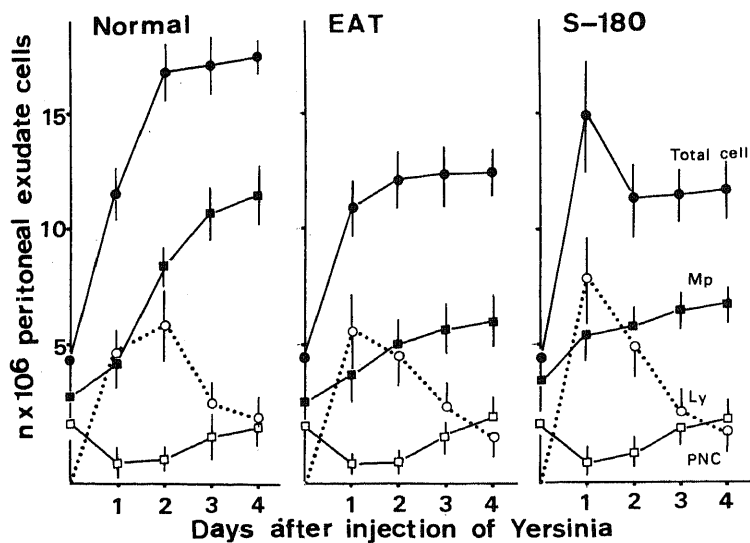


Fig. 9. Yields of *Yersinia*-induced peritoneal exudate cells in tumor-bearing mice. Mice were injected into the right-hind foot pad with the Ehrlich's or sarcoma-180 ascite tumor. 24hrs later 10^6 cells of *Yersinia* were injected intraperitoneally, and the numbers of peritoneal exudate cells were compared with those of control mice. Means \pm S.E. of five mice per time point. Ly: lymphocyte.

が約 40 %抑制され、PNC は約 20 %抑制された。一方、Lm 感染抵抗抑制活性をもつ癌細胞抽出液を同様な方法で測定したところ、担癌血清と同程度の強い Mp 集積抑制活性が認められた (Table 6)。

Ⅷ. 感染抵抗抑制因子と Mp 集積抑制因子のゲル濾過による分離

Lm 感染抵抗抑制と Mp 集積抑制の両活性をもつ担癌血清、癌移植部位洗液 (腹腔洗液)、EAT 抽出液上清をそれぞれ Sebhadox G 75 でゲル濾過を行った。

波長 280nm による吸収曲線は Fig. 10 のようであった。これを流出順に F1 ~ F6 の分画に分けてプールし、凍結乾燥により 1/10 量に濃縮後、各分画の生物活

Table 4. Effect of tumor implantation on macrophage and polymorphonuclear leukocyte accumulations with PHA.

Mice injected with ^{a)}	No. of macrophages accumulated in the peritoneal cavity ($\times 10^6$) ^{b)}	%inhibition ^{c)}	No. of PNC accumulated in the peritoneal cavity ($\times 10^6$) ^{b)}	%inhibition ^{c)}
S-180 cell	3.8 ± 0.7	47.9	2.8 ± 0.9	20.0
EAT cell	3.6 ± 0.8	50.7	2.6 ± 0.6	25.7
ddy spleen cell	8.0 ± 1.2	-9.5	3.6 ± 0.9	-2.8
ICR spleen cell	7.2 ± 1.0	1.4	3.8 ± 1.1	-8.6
No cell (PBS)	7.3 ± 0.8		3.5 ± 1.6	

a) Mice were injected subcutaneously (foot pad) with 1×10^6 indicated cells 2 days before sacrifice.

b) The values represent the mean (\pm S.E.) numbers of macrophage and polymorphnuclea leukocyte recovered from the peritoneal cavity, 24hrs after intraperitoneal injection of 60mcg of PHA from five normal mice or five mice previously injected with the indicated cell type.

c) % inhibition was expressed as (1-values obtained from experimental mice/values obtained from PBS injected mice) $\times 100$.

PHA: phytohemagglutinin.

Table 5. Effect of tumor implantation on foot-pad swelling with PHA

Mice injected with ^{a)}	Food-pad swelling index ^{b)}	% inhibition ^{c)}
EAT cell	13 ± 3	40
S-180 cell	12 ± 3	43
ddy spleen cell	21 ± 4	0
ICR spleen cell	17 ± 2	16
DBA/2 lunge cell	17 ± 2	16
No cell (PBS)	21 ± 3	

a) Mice were injected subcutaneously on the back with 1×10^6 indicated cells. 24hrs later 60mcg of PHA-P were injected into the foot-pad

b) Food-pad swelling index was expressed as (thickness of foot-pad injected with PHA - thickness of PBS control/thickness of PBS control) $\times 100$. Means \pm S.E. of five mice.

c) % inhibition was expressed as (1-values obtained from experimental mice/values obtained from control mice) $\times 100$

性を測定した。3試料とも分子量7800～9000のpolyethylene glycoleの流出位置に近いF4～F5に比較的強い感染抵抗抑制及びMp集積抑制活性が認められ、担癌血清、腹腔洗液ではF1に弱い活性が認められた。PNC集積抑制活性はいずれの分画にも認められなかった。つぎにF1画分を凍結乾燥で濃縮後、Sephadex G200でゲル濾過し、流出順に7分画に分け生物活性を測定した。感染抵抗抑制活性とMp集積抑制活性は、F2, F3, F5の3つの分画に認められた。

考 察

担癌による個体の免疫機能低下現象のうち、T細胞、B細胞活性については既に報告がなされているが、Mpの関与についてはほとんど知られていない。そこでMpの機能が強く関与しているLm感染抵抗性をパラメーターとして、担癌によるMp機能のin vivoの変化を検討した。

まず最初に実験系を確立するために、各系統マウスとEATおよびS-180の間で、Northら⁸⁾⁹⁾の報告した担癌初期マウスのLm感染抵抗抑制が見られるか否かの検討を行った。

の検討を行った。

担癌初期マウスにsublethal doseのLmを静脈内に感染させると、感染後3日目の肝におけるLm増殖は対照の非癌マウスに比べ100～1000倍多く、また癌移植局所においても肝と同様な成績を示し、担癌マウスでは明らかにLm感染に対する抵抗性の低下していることが確認された。更に担癌24時間目の血清を正常マウスにtransferすることにより、そのマウスにLm感染抵抗抑制が起ることを認め、担癌血清中にNorthら⁹⁾のいうLm感染抵抗抑制因子の存在することを確認した。

Lm感染に対する宿主抵抗性はサルモネラ、結核菌、ブルセラの場合と同様細胞性免疫が¹⁰⁾¹⁷⁾主体であるが、免疫応答の成立前の感染初期の抵抗性にはMpが重要な役割を果たしているという立川ら¹⁰⁾、Bennettら¹¹⁾、Northら¹²⁾の知見からみると、担癌初期マウスのLm感染抵抗抑制現象はMpの機能障害が原因であると推定される。試みに感染初期の宿主抵抗性に多核白血球が主役をなすといわれるPsa¹⁰⁾の感染に対し担癌マウスは、Lm感染に対するような抵抗抑制を示さな

Table 6. Effect of serum from tumor-bearing mice or soluble fraction of sonicated tumor cells on the macrophage and polymorphonuclear leukocyte accumulations with PHA.

Mice injected with ^{a)}	No. of macrophages accumulated in the peritoneal cavity ($\times 10^6$) ^{b)}	%inhibition ^{c)}	No. of PNC accumulated in the peritoneal cavity ($\times 10^6$) ^{b)}	%inhibition ^{c)}
EAT-tumor-bearing serum				
1-day serum	4.0 \pm 0.8	41.2	2.7 \pm 0.8	18.2
3-days serum	3.6 \pm 0.6	47.0	2.6 \pm 0.7	21.2
6-days serum	3.8 \pm 0.8	44.1	2.5 \pm 1.0	24.2
9-days serum	4.2 \pm 0.9	38.2	2.7 \pm 1.1	18.2
Normal serum	6.6 \pm 0.5	3.0	3.1 \pm 1.0	6.0
Soluble fraction of sonicated cells				
EAT cell	4.4 \pm 0.6	35.3		
S-180 cell	4.8 \pm 0.4	29.4		
ddy spleen cell	7.0 \pm 1.1	-2.9		
ICR spleen cell	6.5 \pm 0.8	4.4		
PBS control	6.8 \pm 0.8		3.8 \pm 0.8	

a) Mice were injected subcutaneously with 0.3 ml of the indicated serum or soluble fraction of sonicated cells (10^7 /ml) 1 day before sacrifice

b), c) See Table 4.

かったのに反し, Mp が関与するとされる *S. ent.*, *Ye* (Mp 寄生菌) の感染に対しては, Lm 感染と同様に抵抗性の抑制が認められている。

生体内の Mp の主な機能は貪食・殺菌・炎症部位への集積, 活性化などであるが, では担癌初期マウスにおける Lm 感染抵抗の抑制は Mp のどの機能が障害されて生じるのであろうか。

担癌宿主における Mp の貪食能に関してはマウス, ラットおよびヒトにおいて, 末梢血での carbon または aggregated serum albumin のクリアランスが正常宿主に比べ増大しているという報告があり¹⁸⁾¹⁹⁾, ま

た最近 Meltzer ら²⁰⁾は, 3-methylcholanthrene 誘発腫瘍を同系マウスに移植し, 移植初期における腹腔内固有 Mp の貪食能が担癌 3 日目までに正常マウス Mp のそれに比べ 4~5 倍上昇し, 以後癌の増殖に伴って低下すること, 貪食能の増強は担癌血清中に存在する貪食能増強因子によってもたらされることを報告した。これに反し, Gudewicz ら²¹⁾は, 担癌マウスの Mp 貪食能が低下していることを示し, 一方, Saito ら²²⁾は担癌初期マウスの血清中および癌細胞培養上清中に貪食抑制因子が存在することを報告している。本実験においては, Lm に対する EAT 担癌マウスの腹腔内固有

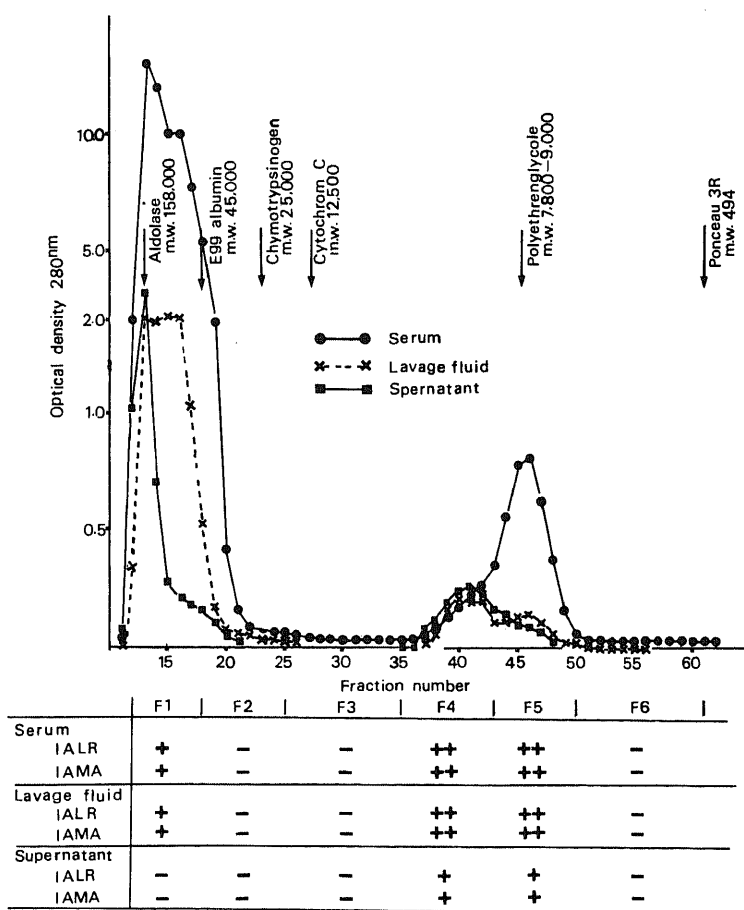


Fig. 10. Sephadex G-75 column chromatography of the serum and lavage fluid from tumor-bearing mice, and supernatant of sonicated tumor cells. Lavage fluid: peritoneal fluid from Ehrlichs-ascite-tumor-bearing mice. Serum: from Ehrlichs-ascite-tumor-bearing mice. Supernatant: supernatant of sonicated Ehrlichs ascite tumor cells ($10^7/\text{ml}$). IALR: inhibitory activity of anti-Listeria resistance. IAMA: inhibitory activity of macrophage accumulation. IALR is expressed as \log_{10} difference growth of the *Listeria* in the liver between tumor-bearing mice and control, and IAMA is expressed as % inhibition of macrophage accumulation. IALR: $<1(-)$, 1.0-1.5(+), 1.5-2.0(++). IAMA: $<20\%(-)$, 20-30%(+), 30-40%(++).

Mpの貧食能は、担癌4日目まで正常マウスの腹腔Mpに比べ有意な差を示さず、またF-SRBCに対する貧食能も同様な成績であるが、担癌6日目を過ぎると、Lmに対する貧食能が著しく増大した。この担癌6日目以後の貧食能の増大は、担癌初期には認められないことから考えて、上述のMeltzerら²⁰⁾のいう担癌初期血清中に存在する貧食能活性化因子によるものでなく、Hopperら²³⁾が指摘しているように、移植腫瘍に対する細胞性免疫の成立により、T細胞から産生されたlymphokineによりMpが活性化されて起ったものと推察される。

ついで、Lm感染抵抗抑制活性をもつ担癌マウス血清が正常マウスの腹腔Mpの貧食能に及ぼす影響をin vitroの系で検討したところ、貧食粒子(F-SRBC)が多い時は正常血清添加群と担癌血清添加群の間に貧食率、貧食indexに差は認められなかったが、貧食粒子を減らすと担癌血清添加群では貧食indexが低下した。この機序や上述のSaitoら²²⁾が報告した担癌血清中の貧食抑制因子との関連は不明であるが、著者の成績から推察すると、担癌血清がMpの運動性(遊走)を抑制するため、少ない粒子をactiveに貧食できないことによるのではないかと考えられる。

担癌初期宿主におけるMpの殺菌能に関しての知見は、これまで殆んど報告されていない。そこで担癌初期マウスの腹腔内にLmを感染させ、腹腔内固有MpのLmに対する殺菌能を検討したところ、正常と担癌マウスの殺菌能の間に差が認められなかった。この成績はLmがMp寄生菌であり、Mp非寄生菌のようにMp内で殺菌されないというこれまでの報告と一致する。このことにより、担癌初期マウスに見られるLm感染抵抗抑制には、Lm増殖部位に存在する固有Mpの殺菌能が関与していないと考えられる。

殺菌能、細菌増殖抑制能、¹²⁵I癌細胞殺滅能²⁴⁾に密接に関与するといわれているMpのlysosomal enzyme活性はこれまでMpの活性化の指標として利用されている。そこで著者は、担癌1日目の腹腔内固有及びLm加熱死菌誘導腹腔MpのLDH、Ap、Lzの3つの酵素活性を測定した。担癌1日目の腹腔内固有のMpは対照の脾細胞移植マウスからの同Mpに比べ3つの酵素活性値に差はなく、またLm加熱死菌誘導Mpでも、酵素活性は上昇したが、対照マウスの間に差を示さなかった。このことから、担癌初期マウスはMpのlysosomal enzyme活性化機構に障害がないものと考えられる。

担癌宿主における炎症細胞の集積抑制は遅延型皮膚反応の低下²⁵⁾²⁶⁾、末梢血単球のchemotaxisの抑

制²⁷⁾²⁸⁾などの現象から推察されている。Snydermanら¹⁴⁾は担癌マウスの腹腔内にPHAを注射し、lymphokine由来²⁷⁾のchemotactic因子によって、24時間以内に腹腔に集積されるMpの数を非癌マウスと比較し、担癌マウスではMpの集積は抑制されているが、PNC集積は抑制されていないことを示した。Meltzerら³¹⁾は担癌マウスにBCG菌を感染させ、腹腔へのMp集積抑制と若干のPNC集積抑制が起ることを報告している。担癌宿主における炎症部位へのMp集積抑制機序については、担癌ラットにおいて癌増殖部位のMp数と炎症部位へのMp集積に相関が見られることや³²⁾、抑制の見られるラットに正常MpをtransferするとMp集積抑制が回復すること³³⁾などから、癌との競合のため炎症部位への集積が低下するという考え方と、ヒト、マウスで見られているように、末梢血中には十分なMp前駆細胞がある³⁴⁾³⁵⁾にもかかわらず癌細胞あるいは癌移植が引き金となって宿主細胞から産生される集積抑制因子によって炎症局所への集積が抑制されるとする二通りの考え方が提唱されている。著者の用いたEAT、S-180担癌初期マウスでは細菌感染あるいはPHAの腹腔及び足趾内刺激に対して、対照の正常脾細胞移植マウスに比べ刺激部位へのMp集積が抑制されていた、またLm感染抵抗抑制をもつ担癌血清および癌細胞破壊上清を皮下に注射し、PHAで腹腔を刺激すると、顕著なMp集積抑制と弱いPNC集積抑制が観察された。即ち、液性因子によるMp集積抑制が明らかとなった。

炎症細胞の集積抑制あるいはchemotaxis抑制に関与する液性因子については、Tillら³⁶⁾、Van Eppsら³⁷⁾は正常及び急性疾患患者血清に、Babaら³⁸⁾はDNFB炎症部位に、Fauveら³⁹⁾は癌細胞培養上清に多核血白血球に対するchemotaxis抑制および集積抑制活性があることを報告している。また宮原ら⁴⁰⁾は癌患者血清中にMp遊走阻止活性があり、これをSephadex G200でゲル濾過すると、3つのピークの直後に流出される画分に活性があることを示した。Snydermanら⁴¹⁾はマウス移植腫瘍であるhepatoma129、lymphoma6C3HD、sarcomaBP8の超音波遠心上清と、その透析膜通過画分にMp集積抑制活性を認めている。著者は担癌血清、担癌移植24時間目の腹腔洗液および癌細胞抽出液にLm感染抵抗抑制活性とMp集積抑制活性があることを確認したが、これら両活性の分子サイズや両活性の物質的異同を検討するために試料のゲル濾過を行った。Sephadex G75でゲル濾過を行うと、いずれの試料も分子量7800～9000の流出画分近くに主活性が、担癌血清と腹腔洗液では

void volum 直後に弱い活性が認められ、この画分を更に Sephadex G200 でゲル濾過すると3つの画分に活性が認められ、また両活性は常に重って溶出された。この成績は Lm 感染抵抗抑制と Mp 集積抑制物質は同一の物質である可能性を示唆するもので、また著者の分離した物質は分子量の点で Snyderman ら⁴¹⁾の報告した Mp 集積抑制物質と類似していた。一方、高分子画分でみられた活性は全く別の物質であるか、あるいは 7,800 ~ 9,000 近くの分子量をもつ物質の凝集あるいは血清タンパクとの非特異的結合によって生じた物質による可能性がある。

では、癌細胞から産生される Mp 集積抑制物質はどのような物質であり、どのような機序によって Mp の集積を抑制するのであろうか、癌細胞は正常細胞にくらべ多量の prostaglandin を産生し^{42,43)}、アデニールサイクラーゼを介し細胞内の c-AMP を上昇させ、PNC、Mp の遊走を調整している可能性が示唆されている⁴⁴⁾。Plescia ら⁴⁵⁾は MC-16 担癌初期マウスに prostaglandin の合成阻害剤である indomethacin を 25 μ g/日の量で10日間投与すると、癌細胞の増殖が抑制されることを報告し、著者も indomethacin を癌移植と同時に投与することにより担癌マウスの Lm 感染抵抗抑制がある程度解除される現象を観察し（未発表）、癌細胞から産生される Mp 集積抑制因子が Prostaglandin あるいはその複合体である可能性を考えているが、この問題は今後の研究に待ちたい。

これまでの成績から、担癌初期マウスにみられる Lm 感染抵抗抑制機序を要約すると、癌移植により、移植部位から直ちに低分子の Mp 集積抑制因子が産生され、血行により全身に広がり、Mp に直接作用するかあるいは Mp の chemotactic 因子を不活化することにより、Lm 増殖部位への Mp 集積が抑制され、Lm の感染に対する宿主抵抗が低下することになる。したがって、この Mp 集積抑制物質の精製およびその性状、拮抗物質の開発が今後の課題である。

結 論

マウスの担癌初期に見られる Lm 感染に対する宿主の抵抗性低下現象とその機序を主に in vivo の系で解析し、以下のような結論を得た。

1. 担癌初期マウスにおける Lm 感染抵抗性の抑制現象とそれに働く血清因子の存在を EAT および S-180 担癌初期マウスで確認した。

2. EAT 担癌初期マウスに S. ent, Ye, Str. A12 および G 群を感染させると、Lm 同様に抵抗抑制が見られたが、Psa, Staph. の感染では認められなかった。

3. Lm 感染抵抗抑制に働く液性因子は担癌血清の他に癌移植部位の組織抽出液および洗液、癌細胞 (EAT, S-180) 抽出液にも存在が認められた。

4. S-180, EAT 担癌初期マウスにおける腹腔内固有 Mp の貪食能および Lm に対する殺菌能は正常脾細胞移植マウスの同 Mp のそれらに比べ有意の差を示さなかった。

5. S-180, EAT 担癌初期マウスの腹腔内固有の Mp 中の LDH, Ap, Lz 活性値は対照の脾細胞移植マウスのそれと比較して差はなく、また Lm 加熱死菌誘導腹腔 Mp のそれとはほぼ同様であった。

6. S-180, EAT 担癌初期マウスでは、Lm および Ye の感染部位または PHA 刺激部位 (腹腔) への Mp の集積が抑制されており、この Mp 集積抑制に働く液性因子が、Lm 感染抵抗抑制活性をもつ担癌血清、癌移植部位組織の抽出液および洗液、癌細胞抽出液に認められた。

7. Lm 感染抵抗性の抑制と Mp 集積抑制の両活性を持つ担癌血清、癌移植部位の洗液 EAT 抽出液を Sephadex G75 でゲル濾過すると、いずれの試料も分子量 7,800 ~ 9,000 の溶出画分近くに両方の活性が重って流出し、担癌血清と腹腔洗液は void volume 直後の画分に弱い活性を示した。

以上の結果から、担癌初期マウスで見られる Lm 感染抵抗性の低下は、癌細胞から産生される Mp 集積抑制因子によって Lm 増殖部位へ Mp が集積されないのが原因であると結論される。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました恩師金沢医科大学西東利男教授に心から感謝の意を捧げます。また御校閲を賜りました倉田自章教授に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Bolton, P. M., Mander, A. M., Davidson, J. M., James, S. L., Newcombe, R. G. & Hughes, L. E. : Cellular immunity in cancer. Brit. Med. J., 3, 18-20 (1975).
- 2) Golb, S. H., Oconnell, T. X. & Morton, D. L. : Correlation of in vivo and in vitro assays of immunocompetence in cancer patients. Cancer Res., 34, 1833-1837 (1974).
- 3) Mekori, T., Sher, S. & Robinson, E. : Suppression of the mitogenic response to phytohemagglutinin in malignant neoplasia. J. Natl. Cancer inst., 52, 9-12 (1974).
- 4) Han, T. & Takita, H. : Immunologic

- impairment in bronchogenic carcinoma. *Cancer*, **30**, 616-620 (1972).
- 5) **Ducos, J., Miguieres, J., Colombies, P., Kessous, A. & Poujoulet, N.** : Lymphocyte response to P. H. A. in patients with lung cancer. *Lancet*, **1**, 1111-1112 (1970).
- 6) **Zella, S., Naor, D. & Tanapatchaiyapong, P.** : Cellular basis of immunodepression in mice with plasmacytomas. *J. Immunol.*, **112**, 2068-2075 (1974).
- 7) **Ting, A. & Terasaki, P. I.** : Depressed lymphocyte-mediated killing of sensitized targets in cancer patients. *Cancer Res.*, **34**, 2694-2698 (1974).
- 8) **North, R. J., Kirstein, D. P. & Tuttle, R. L.** : Subversion of host defense mechanisms by murine tumor. I. A circulation factor that suppresses macrophage-mediated resistance to infection. *J. Exp. Med.*, **143**, 559-573 (1976).
- 9) **North, R. J., Kirstein, D. P. & Tuttle, R. L.** : Subversion of host defense mechanisms by murine tumor. II. Counter-influence of concomitant antitumor immunity. *J. Exp. Med.*, **143**, 574-584 (1976).
- 10) 立川啓二, 光山正雄, 野本久雄, 武谷健二 : 感染防禦における食細胞の役割. Ⅲ. 遊離マクロファージと多核白血球の分離 (細菌学会総会記事), *日細誌*, **33**, 252 (1978).
- 11) **Bennett, M. & Baker, E. E.** : Marrow-dependent cell function in early stages of infection with *Listeria monocytogenes*. *Cell. Immunol.*, **33**, 203-210 (1977).
- 12) **North, R. J.** : The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection. *J. Exp. Med.*, **132**, 521-534 (1970).
- 13) 斉藤和久, 多田隈卓史 : In vitro の抗体産生, マウス脾細胞培養におけるヒジ赤血球抗原に対する primary antibody response, 免疫実験操作法 (日本免疫学会編), 1971 年度版, 353-362 頁, 日本免疫学会方法委員会, 金沢市.
- 14) **Snyderman, R., Pike, M. C., Blaylock, B. L. & Weinstein, P.** : Effects of neoplasms on inflammation : depression of macrophage accumulation after tumor implantation. *J. Immunol.*, **116**, 585-589 (1976).
- 15) **Schnyder, J. & Baggiolini, M.** : Secretion of lysosomal hydrolases by stimulated and nonstimulated macrophages. *J. Exp. Med.*, **148**, 435-450 (1978).
- 16) **Lane, F. C. & Unanue, E. R.** : Requirement of thymus (T) Lymphocytes for resistance to Listeriosis. *J. Exp. Med.*, **135**, 1104-1112 (1972).
- 17) **North, R. J.** : Cellular mediators of anti-*Listeria* immunity as an enlarged population of short-lived, replicating T cells. Kinetics of their production. *J. Exp. Med.*, **138**, 342-355 (1973).
- 18) **Blamey, R. W., Crosby, D. L. & Baker, J. M.** : Reticuloendothelial activity during the growth of rat sarcomas. *Cancer Res.*, **29**, 335-337 (1969).
- 19) **Magarey, C. J. & Baum, M.** : Reticuloendothelial activity in human with cancer. *Brit. J. Surg.*, **57**, 748-752 (1970).
- 20) **Meltzer, M. S. & Stevenson, M. M.** : Macrophage function in tumor-bearing mice : dissociation of phagocytic and chemotactic responsiveness. *Cell Immunol.*, **35**, 99-111 (1978).
- 21) **Gudewicz, P. W. & Saba, T. M.** : Inhibition of phagocytosis and glucose metabolism of alveolar macrophages during pulmonary tumour growth. *Br. J. Cancer*, **36**, 670-677 (1977).
- 22) **Saito, H. & Tomioka, H.** : Suppressive factor against macrophage phagocytosis produced by cultured sarcoma-180 cells. *Gann*, **70**, 671-675 (1979).
- 23) **Hopper, K. E. & Nelson, D. S.** : Specific triggering of macrophage accumulation at the site of secondary tumor challenge in mice with concomitant tumor immunity. *Cell. Immunol.*, **47**, 163-169 (1979).
- 24) **Hibbs, J. B.** : Heterocytolysis by macrophage activated by *Bacillus Calmette-Guerin* : lysosome exocytosis into tumor cells. *Science*, **184**, 468-471 (1974).
- 25) **Catalona, W. J., Taylor, P. T., Rabson, A. S. & Cretien, P. B.** : A method for dinitrochlorobenzene contact sensitization : clinicopathologic study. *N. Engl. J. Med.*, **286**, 399-402 (1972).

- 26) Nelson, M. & Nelson, D. S. : Macrophage and resistance to tumour. I. Inhibition of delayed-type hypersensitivity reaction by tumour cells and by soluble products affecting macrophages. *Immunology*, **34**, 277-290 (1978).
- 27) Boetcher, D. A. & Leonard, E. J. : Abnormal monocyte chemotactic response in cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.*, **52**, 1091-1099 (1974).
- 28) Hausman, M. S., Brosman, S., Snyderman, R., Mickey, R., & Fahey, J. : Defective monocyte function in patients with genitourinary carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 1047-1054 (1975).
- 29) Stevenson, M. M. & Meltzer, M. S. : Depressed chemotactic responses in vitro of peritoneal macrophages from tumor-bearing mice. *J. Natl. Cancer inst.*, **57**, 847-852 (1976).
- 30) Normann, S. J. & Sorkin, E. : Inhibition of macrophage chemotaxis by Neoplastic and other rapidly proliferating cell in vitro. *Cancer Res.* **37**, 705-711 (1977).
- 31) Meltzer, M. S. & Stevenson, M. M. : Macrophage function in tumor-bearing mice : tumoricidal and chemotactic responses of macrophages activated by infection with *Mycobacterium bovis* strain BCG. *J. Immunol.*, **118**, 2176-2181 (1977).
- 32) Eccles, S. A. & Alexander, P. : Sequestration of macrophages in growing tumours and its effect on the immunological capacity of the host. *Br. J. Cancer*, **30**, 40-49 (1974).
- 33) Bernstein, I. D., Wepsic, H. T., Zbar, B. & Rapp, H. T. : Tumor Immunity : impairment in tumor-bearing host. *J. Natl. Cancer Inst.*, **46**, 873-880 (1971).
- 34) Baum, N. & Fisher, B. : Macrophage production by the bone marrow of tumor-bearing mice. *Cancer Res.*, **32**, 2813-2817 (1972).
- 35) Nelson, D. S. & Kearney, R. : Macrophage and lymphoid tissues in mice with concomitant tumour immunity. *Br. J. Cancer*, **34**, 221-226 (1975).
- 36) Till, G. & Ward, P. A. : Two distinct chemotactic factor inactivators in human serum. *J. Immunol.*, **114**, 843-847 (1975).
- 37) Van Epps, D. E., Palmer, D. L. & Williams, R. C. : Characterization of serum inhibitors of neutrophil chemotaxis associated with anergy. *J. Immunol.*, **113**, 189-200 (1974).
- 38) Baba, T., Tazaki, K., Sonozaki, H. & Torisu, M. : A neutrophil chemotactic factor and its inhibitor found in DNCB-induced skin inflammatory lesions. *J. Immunol.*, **118**, 762-768 (1977).
- 39) Fauve, R. M., Hevin, B., Jacob, H., Gaillard, J. A., & Jacob, F. : Antiinflammatory effect of murine malignant cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 4052-4056 (1974).
- 40) 宮原哲郎, 原田素彦, 田中二郎, 自見雅文, 鳥巢要道 : 癌患者血清中に存在するマクロファージ遊走阻止因子について, 日本癌学会総会記事, 第36回総会 (1977, 10月, 東京).
- 41) Snyderman, R. & Pike, M. C. : An inhibitor of macrophage chemotaxis produced by neoplasms. *Science*, **192**, 370-372 (1976).
- 42) Tashjian, A., Voelkel, E., Levine, L. & Goldhaber, P. : Evidence that the bone resorption-stimulating factor produced by mouse fibrosarcoma cells is prostaglandin E₂. *J. Exp. Med.*, **136**, 1329-1343 (1972).
- 43) Edwerd, F., Levine, V. L., Alper, C. A. & Tashjian, A. : Acute phase reactants ceruloplasmin and haptoglobin and their relationship to plasma prostaglandins in rabbits bearing VX2 carcinoma. *J. Exp. Med.*, **147**, 1078-1088 (1978).
- 44) Gallin, J. I., Sandler, J. A., Clyman, R. I., Manganiello, V. C. & Vaughan, M. : Agents that increase cyclic AMP inhibit accumulation of c-GMP and depress human monocyte locomotion. *J. Immunol.* **120**, 492-496 (1978).
- 45) Plesch, O. J. Smith, A. H. & Grinwich, K. : Subversion of immune system by tumor cell and role of prostaglandins. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1848-1851 (1975).

Inhibition of Macrophage Accumulation in Tumor-Bearing Mice—Mitsuhiro Ishikura, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. J. Jusen Med. Soc., 89, 47—64 (1980).

Abstract The present study was undertaken to clarify the mechanisms involved in lowering of resistance to bacterial infection at the early stage subsequent to implantation of Ehrlich's ascites tumor cells or sarcoma-180 cells into mice.

Tumor-bearing mice showed lowered resistance to *Listeria monocytogenes* (L.m.) infection. They showed also lowered resistance to infection with *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* (Y.e.), and *Streptococcus* A-12 or G but not to infection with *Pseudomonas aeruginosa* or *Staphylococcus aureus*.

A humoral factor accounting for the suppress of resistance to L.m. infection was detected in the serum and peritoneal fluid of tumor-bearing mice as well as in the supernatant of sonicated tumor cells.

No difference in the phagocytic and bactericidal activities to L.m. of mouse peritoneal macrophages, as well as in the activation of lysosomal enzymes in macrophages by heat-killed L.m. inoculation was observed in the tumor-bearing mice and the control mice receiving normal spleen cells.

The macrophage accumulation towards L.m.- or Y.e.-infected area or phytohemagglutinin-injected area in tumor-bearing mice was significantly suppressed in contrast with that of the control mice. The humoral factor described above also showed the activity inhibiting the macrophage accumulation.

Sephadex G-75 chromatography of the serum, the peritoneal fluid, and the supernatant of sonicated tumor cells revealed that fractions having the molecular weight ranging 7,800 to 9,000 daltons had the activities inhibiting both the resistance to L.m. infection and the macrophage accumulation.